# PROTEUS IMAC Mini Kit 簡易取扱説明書

**サンプルキット内容(PC-MMCC24)**

・**プレパックレジンプラグ**(Ni-IDA **アガロースレジンカラム**)　24 **個**
・**プレパックレジン用バレル(アングルローター使用で容量** 0.65mL)　24 **個**
・2.2mL **マイクロチューブ**　48 **個**
・5x PBS buffer(Buffer A)　250mL×1 **本**
・1x imidazole buffer(Buffer B)　150mL×1 **本**
・**プラグ挿入用器具**　1 **本**
・**取り扱い説明ハンドブック**

**保存**

**プレパックレジンプラグは、**2〜8**℃で保存して下さい。他は室温保存で問題ありません。**(**バッファー各種は、**0.1%**アジ化ナトリウムを含んでおります。**)
**プレパックレジンプラグを凍結させたり、室温保存しないようにご注意下さい。**

**他の使用器具**

・**フィルターユニット：**0.2μm **と** 1.2μm **のシリンジフィルター(サンプルの前処理に使用します。**)
**例**)　Millipore **社** 0.2μm Steriflip GP unit(**カタログ番号** SCGP 005 25)

**使用方法**

1.**バッファーの調製**

**キットに含まれている** 2 **種類のバッファーを、下の表に記載している割合を参照して混合し、**Binding buffer、Wash buffer、Elution buffer **を調製して下さい。**

| Imidazole concentration (mM) | Recommended usage | Buffer A (ml) (5 x PBS buffer) | Elution buffer B (ml) (1 M imidazole pH 7.4) | Distilled water (ml) | Total volume (ml) |
|---|---|---|---|---|---|
| 10 | Binding buffer | 20 | 1 | 79 | 100 |
| 20 | | 20 | 2 | 78 | 100 |
| 30 | Wash buffer | 20 | 3 | 77 | 100 |
| 50 | | 20 | 5 | 75 | 100 |
| 100 | | 20 | 10 | 70 | 100 |
| 150 | | 20 | 15 | 65 | 100 |
| 200 | | 20 | 20 | 60 | 100 |
| 250 | | 20 | 25 | 55 | 100 |
| 300 | Elution buffer | 20 | 30 | 50 | 100 |
| 350 | | 20 | 35 | 45 | 100 |
| 400 | | 20 | 40 | 40 | 100 |
| 450 | | 20 | 45 | 35 | 100 |
| 500 | | 20 | 50 | 30 | 100 |

株式会社エムエステクノシステムズ
東日本 TEL 03-3235-0673　西日本 TEL 06-6396-6616
e-mail : technosales@technosaurus.co.jp

2.**レジンプラグの挿入**

**プレパックレジンプラグを、挿入用器具でバレルに押し込みます。英文の簡易取扱説明書に記載された図をご参照下さい。**

3.**スピンカラムの平衡化**(**合計遠心時間** 2 **分間**)

0.65mL **の** Binding buffer pH7.4(10mM imidazole)**を、**2 **の操作で組み立てたスピンカラムに入れ、**1,800 **×**g **で** 1 **分間遠心します。**

**この平衡化の操作を、もう一回繰り返します。**

4.**サンプルの前処理**

1mL **のサンプルを、**0.2**μ**m **シリンジフィルターに通し、細胞の残渣・タンパク質複合体の沈殿などを除去します。**

5.**サンプルローディング**(**合計遠心時間** 6 **分間**)

**前処理したサンプルを** 0.65mL **取り、スピンカラムにローディングします。スピンカラムを** 640**×**g **で** 6 **分間遠心します。スピンカラム内にサンプルが残っている場合は、遠心時間または遠心力を増やして下さい。**

**＊カラム洗浄の前に**5.**の操作をもう一度行うことで、目的のタンパク質がレジンプラグに効率よく結合させることが出来ます。**

6.**カラムの洗浄**(**合計遠心時間** 5 **分間**)

**スピンカラムに** 0.65mL **の** Wash buffer,pH7.4(30mM imidazole)**を入れて** 1,800**×**g **で** 1 **分間遠心し、固定化金属イオンに対して親和性を持たない、タグの無いたんぱく質を洗い流して除去します。この操作をあと** 4 **回繰り返します。**

**カラムを通過した洗浄液は分析のために取っておいて下さい。**Imidazole **は** 280nm **の紫外光を吸収するので、目的タンパク質の溶出に** imidazole **を使用する場合には** Wash buffer **を分光光度計のブランクとして利用することをお勧めします。**

7.**タンパク質の溶出**(**合計遠心時間** 2 **分間**)

**新しいマイクロチューブにスピンカラムを移します。スピンカラムに** 0.65mL **の** Elution Buffer,pH7.4(300mM imidazole)**を入れ、**1,800**×**g **で** 1 **分間遠心して** His **タグタンパク質を溶出します。**

**レジンプラグに結合した組み換えタンパク質が完全に回収されるまで、この操作を繰り返します。**

**＊溶出液をプールする前に、各溶出画分のタンパク質濃度**(**含量**) **を確認し、精製タンパク質を希釈してしまわないようご注意下さい。**

株式会社エムエステクノシステムズ
東日本 TEL 03-3235-0673 西日本 TEL 06-6396-6616
e-mail : technosales@technosaurus.co.jp

8.脱塩と濃縮

限外ろ過あるいは透析を行って溶出液から imidazole や他の金属イオンを除去し、次のアプリケーションに適したバッファーと交換します。さもないと、残留している imidazole が目的の金属タンパク質から金属イオンを奪ったり、-20℃か-80℃保存下でタンパク質の不可逆的な沈殿を引き起こしたりすることがあります。

9.IMAC ミニプラグの再生

スピンカラムに 0.65mL の Elution Buffer を加え、1,800×g で 1 分間遠心してミニプラグを洗浄します(洗浄は 2 回行います)。続いて、スピンカラムに 0.65mL の Binding Buffer を加え、同様の遠心操作を 2 回行います。

すぐに次の精製を行う場合は、再び手順 1 または 2 から操作を進めて下さい。

また、再生したプラグは保存することもできます。エンドキャップを外したままで 0.1%アジ化ナトリウム溶液(超純水で調製)に浸し、次の使用まで 2～8℃で保存して下さい。